

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. G. Schaltenbrand

ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HÖHE DER UV-ABSORPTION
DES LIQUORS BEI 265 m μ UND DEM GEHALT
AN ASCORBINSÄURE UND PHOSPHORVERBINDUNGEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Marianne Imhoff

aus Gleiwitz/Oberschlesien



Würzburg 1959

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. G. Schaltenbrand

ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HÖHE DER UV-ABSORPTION
DES LIQUORS BEI 265 m μ UND DEM GEHALT
AN ASCORBINSÄURE UND PHOSPHORVERBINDUNGEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Marianne Imhoff

aus Gleiwitz/Oberschlesien

Würzburg 1959

Referent: Professor Dr. G. Schaltenbrand

Tag der Promotion: 11. 3. 59

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

- I. Bisherige Untersuchungen über das Verhalten des Liquors im ultra-violetten (UV) - Licht.
- II. Fragestellung: Zusammenhang zwischen Höhe der UV - Absorption des Liquors bei 265 μ und dem Gehalt an Ascorbinsäure und Phosphorverbindungen.
 - A. Ascorbinsäuregehalt und UV-Spektrum des Liquors.
 1. Methode zur Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes.
 - a) Ascorbinsäurebestimmung an 56 Liquores.
 - b) Versuche mit reiner Ascorbinsäure und Liquor- Ascorbinsäuremischungen.
 2. Ergebnisse.
 - B. UV-Spektrum des Liquors und Phosphorgehalt.
 1. Anorganischer Phosphor.
 - a) Methode zur Phosphorbestimmung im Liquor.
 - b) Ergebnisse.
 2. Organischer Phosphor.
 - a) Methode zur Darstellung organischer Phosphorverbindungen (Chromatographisches Verfahren).
Allgemeine Hinweise auf die Papierchromatographie.
FLECKENSTEINsche Methode.
 - b) Nachweis der einzelnen Phosphorverbindungen.
Molybdatreaktion.
Resistenztest.
Photoprintverfahren.
 - c) Versuche und Ergebnisse nach Anwendung der Lösungsmittel.
 - d) Sicherung der Ergebnisse mittels des R_f - Wertes.
 - e) Bemühungen um ein Konzentrierungsverfahren zur Anreicherung der organischen Phosphorbestandteile im Liquor.
 - f) Einige besondere Beobachtungen.
 - g) Liquor-Phosphoruntersuchungen verschiedener Autoren.
- III. Zusammenfassung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153517_0211

I.

BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN DES LIQUORS IM ULTRAVIOLETTEN (UV) LICHT

In den letzten Jahren haben SPIEGEL-ADOLF, KOVACS, SOPHIAN u. a. mehrfach über Untersuchungen des Liquors im ultravioletten (UV) Licht berichtet. SPIEGEL-ADOLF fand ein hohes Absorptionsmaximum des Liquors bei 265 m μ und macht für dessen Zustandekommen bestimmte Stoffe wie Ascorbinsäure, Nukleinsäuren und ihre Derivate verantwortlich. Weiterhin sah sie eine Abhängigkeit der Höhe der Absorption von der jeweiligen Temperatur und dem Intervall zwischen Entnahme und UV-Messung des Liquors.

An Hand sehr zahlreicher UV-Absorptionsuntersuchungen an pathologischen und normalen Liqueores hat STEGER herausgestellt, daß es im Grunde nur zwei Absorptionsmaxima gibt und zwar das hohe, aber labile Maximum im Bereich von 265 m μ und das Maximum bei 279/280 m μ , das der Absorption durch das Eiweiß entspricht. Das Eiweißmaximum wird aber meist durch das Maximum bei 265 m μ überdeckt und tritt erst nach Abbau dieses labilen Maximums zu Tage. Nur in sehr eiweißreichen Liqueores findet man von vorneherein die höchste Extinktion bei 279/280 m μ .

Läßt man den Liquor bei Zimmertemperatur stehen, dann sinkt das am frischen Liquor gemessene Maximum bei 265 m μ bald ab und ist nach etwa 20 Stunden völlig verschwunden. Dagegen hält sich im Eisschrank bei einer Temperatur zwischen 0 und +4° C das Maximum über mehrere Tage. Ebenso sieht man bei Bebrütung von Serum-Liquormischungen (1:100) ein Absinken der Absorptionshöhe bei 265 m μ , während ein Zusatz von Serum

in größerer Menge den Extinktionsabfall verzögert. In hoher Konzentration (Mischungsverhältnis 1:20) kann das Serum sogar ein Ansteigen des Maximums bei 265 m μ erwirken.

Bei Zusatz von Ribonukleinsäure (die auch ihr Absorptionsmaximum bei 265 m μ hat) zu Liquor kann es zu einer Erhöhung der Extinktion kommen, die aber nach Bebrütung wieder absinkt. Diese Versuche zeigen, daß im frischen Liquor Fermente in aktiver Form vorliegen müssen.

STEGER nimmt zur Erklärung dieses Verhaltens zwei entgegengesetzt wirkende Fermente an, von denen das eine bevorzugt im Serum, das andere vorwiegend im Liquor vorhanden sein müßte.

STEGER sah ferner nach Zugabe von Monojodessigsäure zum Liquor eine Fixierung des Maximums bei 265 m μ , da das Fermentgift selbst bei Bebrütung einen weiteren Abbau des Maximums offenbar verhinderte.

An einer größeren Anzahl von frisch gemessenen Liquores ist es STEGER gelungen, Beziehungen zwischen Extinktionshöhe und Erkrankung zu ermitteln. Es zeigte sich, daß Hirntumoren, genuine Epilepsien, Hydrocephalus interni und die entzündlichen, besonders die chronisch entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems eine vorwiegend hohe Absorption bei 265 m μ aufweisen. Ein mittleres Absorptionsmaximum, d.h. eine Extinktion bei 265 m μ , die zwischen 0,7 und 1,2 liegt, haben die symptomatischen Epilepsien, Hirnatrophien und die postencephalitischen Zustände. Fehlende oder sehr niedrige Absorptionsmaxima findet man bei den Encephalomalacien, cerebralen Gefäßprozessen und Polyneuritiden, während Restzustände nach Hirntraumen, Cervikalsyndrome und Cephalgien etwa gleich häufig mit niedrigen, mittelhohen und sehr hohen Extinktionen bei 265 m μ einhergehen.

Die unterschiedlichen Absorptionshöhen des Liquors können als Ausdruck erhöhter Stoffwechselvorgänge in Gehirn und seinen Häuten aufgefaßt werden. STEGER denkt an das Vorhandensein von Ribasen und Phosphatasen, an Nukleinsäure und ihre Derivate sowie an organische und anorganische

Phosphorverbindungen, weil gerade die entzündlichen Prozesse mit ihren hohen Absorptionsmaxima auch im Liquor mit erhöhtem Gehalt an Phosphaten und anderen Stoffwechselprodukten einhergehen. Bei Erkrankungen mit niedrigen oder fehlenden Absorptionsmaxima, wie den Encephalomalacien und den cerebralen Gefäßprozessen vermutet er Fermente und Inaktivatoren, die aus dem Gehirn oder Serum in den Liquorraum gelangen und Substanzen, die das UV-Spektrum des Liquors bestimmen, entweder nicht entstehen lassen oder sie in solche Endstufen abbauen, die eine UV-Absorption nicht mehr erkennen lassen. Außerdem könnte nach STEGER die UV-Absorption im Bereich von 265 μ auch durch Substanzen hervorgerufen werden, die so labil sind, daß ihre optische Aktivität durch äußere Einflüsse in dem für den Liquor charakteristischen Wellenbereich von 220-320 μ verloren geht.

II.

FRAGESTELLUNG

Aus diesen Erwägungen heraus lag es nahe, sich die Frage vorzulegen, welche Substanzen des Liquors an dem Aufbau des Maximums 265 μ beteiligt sind. Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen soll sich auf die Ascorbinsäure und den Phosphorgehalt des Liquors beschränken.

A.

ASCORBINSÄUREGEHALT UND UV-SPEKTRUM DES LIQUORS

SPIEGEL-ADOLF hat, wie bereits erwähnt, darauf hingewiesen, daß u. a. die Ascorbinsäure für das Zustandekommen des Maximums in Frage käme. Dies erscheint verständlich, da die Ascorbinsäure ihr Absorptionsmaximum bei 255 μ aufweist, also ganz in der Nähe des von uns zu untersuchenden Maximums. Da die Ascorbinsäure besonders im p_H -Bereich des

Liquors instabil ist und der Liquor außerdem noch Fermente enthält, die die spezifische Absorption von Nukleinsäure und deren Abkömmlingen anscheinend vermindern können, sind demnach wohl beide Faktoren imstande, die Extinktion bei 265 m μ zu vermindern.

PRATUSEVIČ berichtet über Änderungen des Ascorbinsäuregehaltes im Liquor cerebrosppinalis und im Blut bei einigen Neuroinfekten von Kindern. Der Autor gibt für den normalen Liquor einen Ascorbinsäuregehalt von 1,4 - 2,95 mg% an und findet, daß im Stadium der akuten Poliomyelitis die Werte stark sinken, in der Rekonvaleszenz jedoch wieder zunehmen. Auch akute Encephalitiden zeigen eine erhebliche Ascorbinsäureverminderung, aber nur ein sehr langsames Wiederansteigen der Werte, während nur geringe quantitative Veränderungen des Ascorbinsäuregehalts im Liquor bei der akuten Chorea beobachtet wurden.

1. Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes (modifizierte Methode nach TILLMANS)

Um die Abhängigkeit des Absorptionsmaximums des Liquors bei 265 m μ von dem jeweiligen Ascorbinsäuregehalt zu untersuchen, wurde eine titrimetrische Bestimmung der Ascorbinsäure durchgeführt. Bei dieser Methode reagiert Ascorbinsäure mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol unter Farbumschlag. Dieser Vorgang beruht auf der reduzierenden Eigenschaft der Ascorbinsäure, die auf eine im Molekül enthaltene Dienol-Gruppe ($\begin{smallmatrix} \text{C} & \text{C} \\ | & | \\ \text{OH} & = & \text{OH} \end{smallmatrix}$) zurückzuführen ist. Da die Farbstoffpräparate niemals ganz rein sind, wurde erst der Titer der Farbstofflösung gegen reine, kristallisierte Ascorbinsäure eingestellt.

Dieses titrimetrische, auf Reduktion beruhende Nachweisverfahren ist insofern nicht streng spezifisch, als hierbei auch etwaige andere Substanzen, die die gleiche Dienol-Gruppe enthalten (z. B. Dioxymaleinsäure), sowie reduzierende SH-Verbindungen mit erfaßt werden. Für die praktische Beurteilung dürfte diese Tatsache jedoch keine wesentliche Rolle spielen,

da man im allgemeinen mit der Anwesenheit dieser Substanzen nicht zu rechnen braucht. Man kann also annehmen, daß die Reduktionswirkung des Liquors vorwiegend auf dem Ascorbinsäuregehalt beruht.

2. Ergebnisse

- a) Nachdem von 56 Liquores einmal der Ascorbinsäuregehalt bestimmt worden war, zum anderen deren jeweilige Extinktion bei 265 m μ , bildeten wir 3 Gruppen der Extinktionshöhe, nämlich die Gruppe mit niedriger Extinktion (unter 0,7), die mittelhohe Gruppe (Extinktion zwischen 0,7 und 1,2) sowie die Gruppe mit hoher Extinktion (über 1,2) und errechneten für jede Gruppe den Durchschnittswert der Ascorbinsäure. Aus Tabelle 1 sind die Ergebnisse ersichtlich.

Tabelle 1

Anzahl der Fälle	10	22	24
Extinktion bei 265 m μ	niedrig < 0,7	mittelhohe 0,7 - 1,2	hoch > 1,2
Durchschnittswerte des Ascorbinsäuregehalts	0,97 mg%	1,56 mg%	3,54 mg%

Ascorbinsäuredurchschnittswerte von 56 Liquores in Zuordnung zu 3 Extinktionsgruppen (niedrige, mittelhohe und hohe Extinktion) beim 265 m μ -Maximum

Liquores mit einer Extinktion unter 0,7 bei 265 m μ ergaben geringe Werte für die Ascorbinsäure. Dagegen zeigten Liquores mit einer hohen Extinktion (über 1,2) auch einen hohen Ascorbinsäuregehalt. Bei den Liquores mit mittlerer Extinktion fanden wir durchschnittlich höhere Werte als bei Liquores mit niedriger Extinktion, doch fällt auf, daß bei dieser Gruppe die Ascorbinsäurewerte, allerdings nur in Einzelfällen, in einem Bereich zwischen 0,2 und 2,8 mg% schwanken.

Die Ascorbinsäurewerte sind in Abhängigkeit von den Extinktionen in Abb. 1 graphisch dargestellt. Eine Parallelität läßt sich deutlich ablesen. Je höher die Extinktion (Abszisse), desto größer auch der im frischen Liquor bestimmte Ascorbinsäuregehalt (Ordinate).

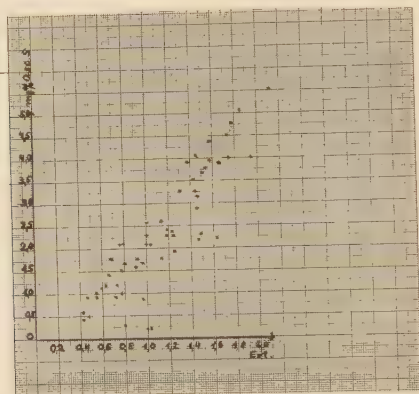


Abb. 1: Zuordnung der Ascorbinsäurewerte zu den Extinktionen des Liquors bei 265 $m\mu$

- b) Eingangs wurde schon erwähnt, daß das Maximum des frischen Liquors bei 265 $m\mu$ schnell absinkt und bald verschwunden ist. Zum Nachweis, daß die Ascorbinsäure an diesem labilen Maximum beteiligt ist, machten wir Versuche mit reiner Ascorbinsäure, sowie mit einer Mischung aus Liquor und Ascorbinsäure.

Wir unterzogen so zunächst eine frisch bereitete Ascorbinsäurelösung (Acidum ascorbicum p. a. Merck, 0,005 %) sofort der UV Messung und fanden ein Absorptionsmaximum bei 255 $m\mu$, das nach Einleiten von Sauerstoff und bei Lichtzutritt nach 30 Minuten merkbar, nach einer Stunde jedoch deutlich abgebaut ist und nach weiterer Zeit zu den Wellenlängen 260/265 $m\mu$ verschoben erscheint. Das Ergebnis ist in Abb. 2 veranschaulicht.

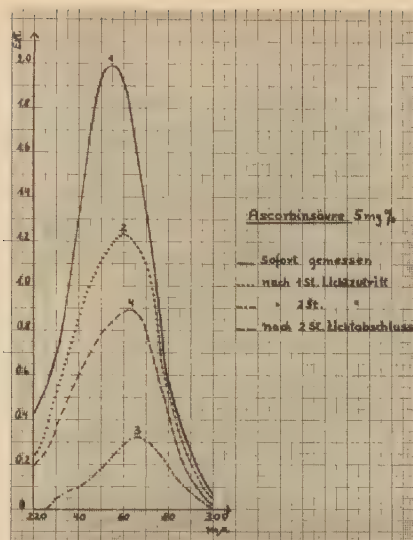


Abb. 2: Die UV-Absorptionskurve einer frisch zubereiteten 0,005 % Ascorbinsäurelösung verschiebt ihr Maximum von 255 mμ unter der Einwirkung der atmosphärischen Luft und des Lichtes nach 265 mμ unter gleichzeitigem starken Extinktionsabfall. Unter Lichtabschluß behält die Ascorbinsäurelösung nach dem gleichen Zeitraum von 2 Stunden eine höhere Extinktion bei.

Eine Aufbewahrung der Ascorbinsäurelösung unter Luft- und Lichtabschluß konnte das Absinken des Maximums offenbar verzögern, aber nicht aufhalten. Auch L. H. SOPHIAN und Mitarbeiter haben beschrieben, daß sich bereits nach 5 Minuten oxydative Veränderungen der Ascorbinsäure bemerkbar machen, die das Ergebnis der UV-Absorptionskurven deutlich beeinflussen.

Außerdem wurde folgende Versuchsanordnung gewählt: Von nativem, frisch entnommenem Liquor, einer 0,005 % frisch bereiteten Ascorbinsäurelösung, sowie von Liquor mit einem geringen Zusatz dieser Ascorbinsäurelösung stellten wir jeweils die Absorptionskurven im

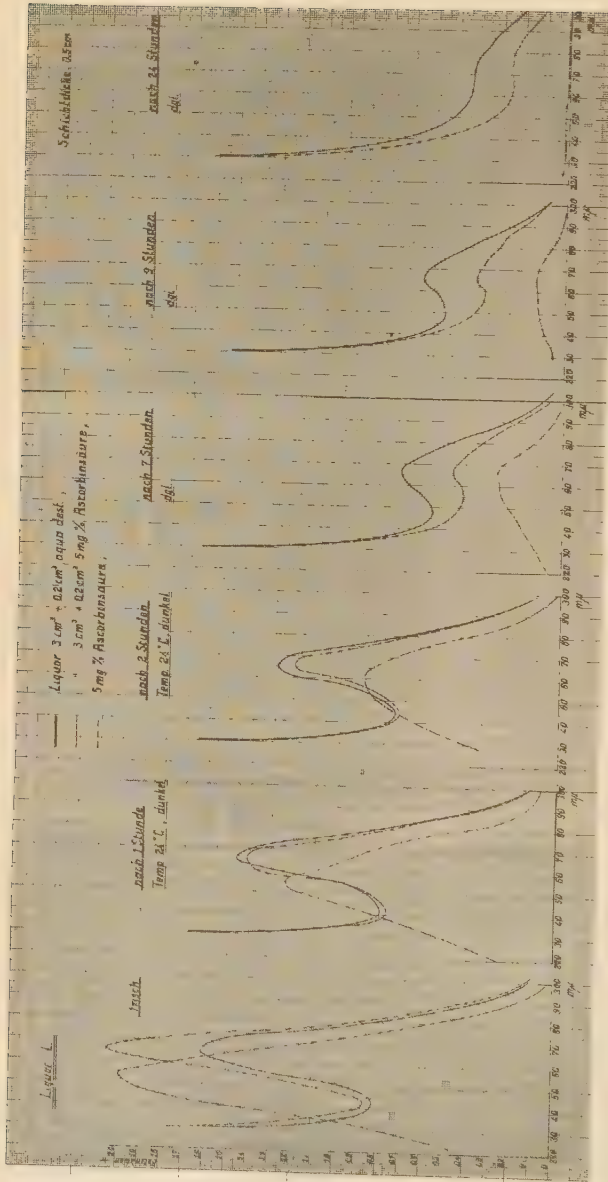


Abb. 3: Die Höhe des Absorptionsmaximums bei 265 mμ sinkt unter Bebrütungsbedingungen bei der Liquor-Ascorbinsäuremischung und bei der reinen Ascorbinsäure relativ schneller als beim nativen Liquor.

Bereich zwischen 230 und 300 μ auf. Die Aufbewahrung der Proben geschah unter Lichtabschluß bei 24° im Thermostaten und die UV-Messung erfolgte jeweils nach 1, 2, 7, 9 und 24 Stunden. Die einzelnen zur UV-Messung notwendigen Portionen wurden nur einmal benutzt, da schon eine geringe UV-Bestrahlung ein Absinken des Maximums hervorrufen kann.

In Abb. 3 sind die Kurven einander gegenübergestellt. Aus dem Kurvenverlauf wird ersichtlich, daß ein Zusatz von Ascorbinsäure das Maximum erhöht, daß aber die reine Ascorbinsäurelösung, sowie auch das Liquor-Ascorbinsäuregemisch unter Bebrütungsbedingungen schneller abgebaut werden als das Absorptionsmaximum des nativen Liquors.

Daraus muß gefolgert werden, daß die Ascorbinsäure allein nicht für das Zustandekommen des 265 μ -Maximums voll verantwortlich sein kann, sondern es müssen noch andere Stoffe daran beteiligt sein. Es lag nahe, an die höheren Phosphorsäuren, besonders an die Adenosin-triphosphorsäure und an die Adenosindiphosphorsäure zu denken. Aus diesen Überlegungen heraus wurde versucht, die Beziehungen zwischen dem 265 μ -Maximum und dem Phosphorgehalt des Liquors aufzudecken.

B.

UV-SPEKTRUM DES LIQUORS UND PHOSPHORGEHALT

1. Anorganischer Phosphor

a) Methode zur Phosphorbestimmung im Liquor

Der Liquor-Phosphorgehalt wurde nach dem Verfahren von BEREN-BLUM und CHAIN bestimmt. Diese Methode soll sehr empfindlich sein und sich durch einen großen Sicherheitsfaktor auszeichnen, was wir durch die gut übereinstimmenden Werte bei den stets durchgeführten Doppelbestimmungen und durch den minimalen Veraschungsverlust bei vergleichenden Untersuchungen mit P-haltigen Testsubstanzen bestätigen können.

Das Liqueureiweiß wird mit Trichloressigsäure gefällt, im Überstand der anorganische Phosphor und - nach Veraschen des nativen Liquors - der Gesamtphosphor, jeweils nach Eintreten der Molybdatreaktion, bestimmt. Aus dem der P-haltigen Versuchsmenge zugesetzten Ammonmolybdat entsteht Phosphormolybdatssäure, die durch Zugabe eines Reduktionsmittels zu einer kolloidalen Lösung von Molybdänblau reduziert wird. Die Intensität der Blaufärbung ist dem P-Gehalt direkt proportional und kann im Elektrokolorimeter (Elko von Zeiss) gemessen werden.

b) Ergebnisse

Es wurden wiederum eine Anzahl von Liquores in 3 Gruppen eingeteilt, je nach ihrer Extinktionshöhe bei 265 m μ (Gruppe 1 unter 0,7, Gruppe 2 zwischen 0,7 und 1,2, Gruppe 3 höher als 1,2), ihr P-Gehalt bestimmt und diese Werte den 3 Gruppen zugeordnet. Aus Tabelle 2 ist folgendes abzulesen: Liquores mit einer niedrigen Extinktion bei 265 m μ weisen auch die tiefsten Werte für den Phosphorgehalt, diejenigen mit hoher Extinktion bei 265 m μ die höchsten Phosphorwerte auf. Bei einer Extinktion über 1,2 ergab sich durchschnittlich ein Gehalt an anorganischem Phosphor von 1,59 mg%, für

Liquores mit einer Extinktion zwischen 0,7 und 1,2 ein Durchschnittswert von 1,42 mg% und bei einer Extinktion unter 0,7 lag der durchschnittliche Gehalt an anorganischem Phosphor bei 1,18 mg%.

Tabelle 2

Anzahl der Fälle	8	21	18
Extinktion bei 265 m μ	< 0,7	0,7 - 1,2	> 1,2
Durchschnittswerte für anorg. Phosphor	1,18 mg%	1,42 mg%	1,59 mg%
Gesamtphosphor	1,40 mg%	1,66 mg%	1,72 mg%

Durchschnittswerte für anorganischen und Gesamtphosphor in Zuordnung zu den 3 Extinktionsgruppen

Die Korrelation zwischen Extinktionshöhe bei 265 m μ und dem Phosphorgehalt des Liquors ist also gegeben.

Vor einiger Zeit hat HOFFMANN über den anorganischen Phosphor im Liquor berichtet und als normalen Durchschnittswert 1,41 mg% angegeben. Er hat weiterhin gefunden, daß bei entzündlichen Erkrankungen die Werte ansteigen. Bei Virusmeningitiden fand der Autor einen Durchschnittswert für anorganischen Phosphor im Liquor von 1,5 mg%, bei Meningokokkenmeningitiden von 1,6 mg% und bei tuberkulösen Meningitiden von 2,0 mg%. Er hatte die modifizierte Methode von FISKE und SUBBAROW angewandt. Mit der gleichen Methode arbeiteten FRIEDMAN und LEVINSON, deren Durchschnittswerte im gleichen Bereich lagen. Eine signifikante Erhöhung des anorganischen Liquorphosphors wurde ebenfalls bei den Meningitiden (tuberkulöse und eitrige Meningitis) und bei den akuten Encephalitiden gefunden. Nach ODESSKY und Mitarbeitern ist im akuten Stadium der Polio-myelitis, der Maserncephalitis und anderer neuroviraler Infekte eine Erhöhung des anorganischen Phosphors zu beobachten, während HOFFMANN die-

selbe erst im chronischen Stadium der Erkrankungen feststellte.

Auf welche Weise es bei den organischen, vorwiegend entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems zu einer Steigerung des anorganischen Phosphors im Liquor kommt, kann noch nicht sicher beantwortet werden. ODESSKY und Mitarbeiter führen hierfür ineinandergreifende Vorgänge an, wie Zerstörung phosphorhaltigen Nervengewebes, Diffusion von Serum durch die veränderte Blut-Liquorschranke und die Notwendigkeit der Aufrechterhaltung des p_H . Auch eine Änderung des Donnan-Gleichgewichtes zwischen Serum und Liquor könne man in Betracht ziehen, ebenso wäre eine Direktwirkung von Viren auf spezifische P-haltige Hirngewebskomponenten im Liquor zu erwägen. KOVACS nimmt an, daß unter Entzündungsbedingungen die große Durchlässigkeit der Meningen verantwortlich gemacht werden kann für das Auftreten von Nukleinsäuren im Liquor.

2. Organischer Phosphor

Bei den bisher besprochenen Methoden mittels chemischer Bestimmung kann man nur aus der Differenz zwischen Gesamtphosphor und anorganischem Phosphor auf den organischen Anteil des Phosphors im Liquor schließen. Danach dürften nur sehr geringe Mengen von organischen Phosphorverbindungen im Liquor vorliegen.

Da nun aber der anorganische Phosphor (in Form von Na_2HPO_4), selbst bei relativ hoher Konzentration (2, 5%) im UV-Spektrum nur eine unwesentliche Absorption im Wellenbereich von 220-320 $m\mu$ aufweist, legten wir uns die Frage vor, ob das Maximum bei 265 $m\mu$ im Liquor neben der Ascorbinsäure nicht auch durch organische Phosphorverbindungen bedingt sein könnte.

Man findet nun tatsächlich ein sehr hohes Absorptionsmaximum bei 260/265 $m\mu$, bei den organischen P-Substanzen wie Adenosintriphosphorsäure (ATP), Adenylsäure = Adenosinmonophosphorsäure (AMP) und Ribo-

nukleinsäure selbst in sehr geringer Konzentration. Der Absorptionsgipfel bewegt sich für die ATP und AMP bei Änderung der Konzentration und damit des p_H zwischen 260 und 265 $m\mu$, während sich die Ribonukleinsäure meist gleich auf den Gipfel 265 $m\mu$ "einstellt". Analoge Beobachtungen machte auch KOVACS bei Nukleinsäure. Der Verlauf der Absorptionskurven dieser Substanzen zeigt zwischen 220 und 320 $m\mu$ eine überzeugende Ähnlichkeit mit der Absorptionskurve des Liquors. Dies wird aus Abb. 4 ersichtlich.

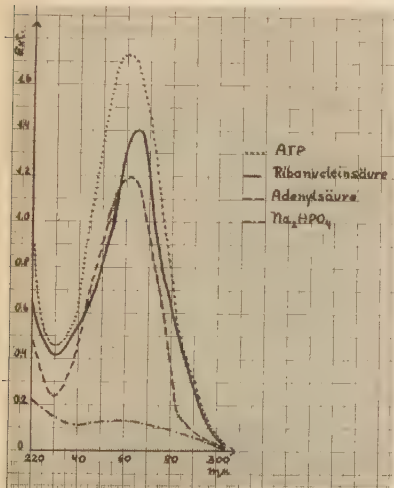


Abb. 4: Die Absorptionskurven von ATP, Ribonukleinsäure und Adenylsäure zeigen ein hohes Maximum bei 265 $m\mu$, während anorganisches Phosphat keine charakteristische Absorption in diesem Bereich hat.

a) Methode zur Darstellung der Phosphorverbindungen (Chromatographisches Verfahren)

Zur Darstellung der organischen Phosphorverbindungen des Liquors wurde das zweidimensionale papierchromatographische Verfahren von FLECKENSTEIN benutzt, das die Trennung organischer Phosphate (ATP, Adenosindiphosphorsäure (ADP) und Adenylsäure) von den anorganischen Phosphorverbindungen gestattet.

Zunächst seien einige allgemeine Hinweise auf die Papierchromatographie gegeben.

Der russische Forscher TSWETT entwickelte zu Beginn dieses Jahrhunderts eine Adsorptionsmethode zur Trennung von Pflanzenstoffen, die er wegen der am Adsorbens gebildeten Farbzonen "Chromatographie" nannte. Später wurde diese Methode auch zur Trennung nicht gefärbter, jedoch durch Farbreaktionen erkennbar zu machender Substanzen weiter ausgebaut. 1944 fanden die Engländer CONSDEN, GORDON und MARTIN das Verfahren der Papierchromatographie, das völlig neue Möglichkeiten eröffnete, besonders dort, wo die üblichen analytischen Verfahren weitgehend versagen mußten. Mit dieser Methode sind nämlich noch Trennungen von abnorm kleinen Substanzmengen durchführbar. Der große Vorzug der Chromatographie liegt darin, die Zerlegung komplizierter Gemische chemisch verwandter Stoffe, die sonst nur schwer oder überhaupt nicht zu trennen sind, zu ermöglichen.

Die Papierchromatographie ist eine besondere Art der Verteilungschromatographie. Der Trägerstoff ist dabei das Filterpapier, das mit der zu untersuchenden Substanz beladen wird. Das eine Ende des Filterpapiers wird in das Lösungsmittel getaucht, das sich kapillar weitersaugt und nach und nach den Streifen durchtränkt. Die einzelnen Komponenten des zu analysierenden Gemisches wandern dabei verschieden schnell. Sie setzen sich in Form von Flecken oder Zonen - zunächst meist unsichtbar und erst durch Sprühreagenzien gefärbt sichtbar zu machen - in unterschiedlichen Entfernungen vom Startpunkt ab und können dann durch Vergleich ihrer Positionen mit denen der Testsubstanzen identifiziert werden. Läßt man das Lösungsmittel im Sinne der Erdanziehung sich abwärts bewegen, dann wird das Verfahren als "absteigend" bezeichnet; saugt sich das Lösungsmittel entgegen der Erdanziehung im Papier hoch, dann spricht man von "aufsteigender" Chromatographie.

FLECKENSTEINsche Methode:

Als Trägerstoff kam Whatman-Papier Nr. 1 sowie Filterpapier von Schleicher und Schüll Nr. 2043a und b zur Verwendung. Um den störenden Phosphatgehalt und den Gehalt an Schwermetallionen des Filterpapiers zu vermindern, werden die Papiere 30 Minuten in eine 0,5 %ige wässrige Lösung von äthylendiamintetraessigsurem Natrium = Titriplex III (durch Zusatz von NaOH auf $p_H=8,5$ gebracht) eingelegt und dann 6 mal mit reichlich Aqua dest. gewaschen. Die Trocknung der Papiere erfolgt bei Zimmertemperatur. Danach werden diese (Abb. 5) in der Mitte leicht geknickt und 4 cm

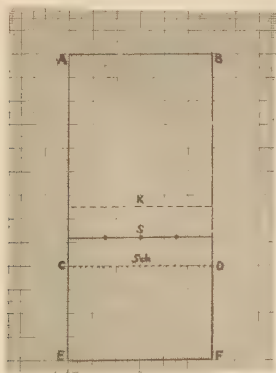


Abb. 5: Papier vor Anwendung des 1. Lösungsmittels:

K = Knickecke

S = Startlinie

Sch = Schnittlinie vor Anwendung des 2. Lösungsmittels

von der Knickecke (K) entfernt die Startlinie (S) markiert, auf der dann übereinander 0,5 - 1,0 ml frischer, eisgekühlter Liquor aufgetragen wird. Ein kalter Luftstrom von zwei Föhnen trocknet den Startpunkt, ehe der nächste Tropfen Liquor aus gekühlter Pipette an die gleiche Stelle gesetzt wird. Das Auftauen des eingefrorenen Liquors erfolgte erst unmittelbar vor dem Aufziehen in die Pipette, um eine Zersetzung der sehr labilen organischen Phosphorverbindungen nach Möglichkeit zu verzögern. Neben dem Liquorstartpunkt, der möglichst klein zu halten ist, werden im Abstand von etwa je 4 cm die Testsubstanzen aufgebracht.

Nach vollständiger Trocknung aller Startflecke vollzieht sich die chromatographische Trennung in Trögen, die zur Konstanterhaltung der Tempera-

tur mit einem Schlauchsystem umgeben sind, durch das Wasser aus einem Thermostaten gepumpt wird.

Im ersten Arbeitsgang kommt zur Trennung der organischen von den anorganischen Phosphorverbindungen das Lösungsmittel I (90 T Isopropyläther + 60 T 85 - 90 % Ameisensäure) 4-5 Stunden "aufsteigend" bei einer Temperatur von 18°C zur Anwendung. Hierbei tauchen die Papiere mit der Knicklinie in das Lösungsmittel ein, während die beiden Enden an einem Glasrechen befestigt sind (Abb. 6). Bei Einwirkung dieses Lösungsmittels

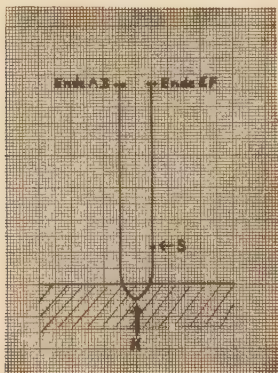


Abb. 6: Anwendung des 1. Lösungsmittels. Die Knicklinie taucht in das Lösungsmittel ein, Die Startlinie befindet sich über dem Flüssigkeitsspiegel.

(S = Startlinie, K = Knicklinie)

bleiben ATP und ADP an der Startlinie zurück, AMP entfernt sich nur wenig, der anorganische Phosphor dagegen wandert in 5 Stunden etwa 6-8 cm vom Startpunkt weg.

Nach dem ersten Trennungsgang werden die Chromatogramme bei Zimmertemperatur gründlich getrocknet und dann das Papier in einer Entfernung von 4 cm parallel zur Startlinie abgeschnitten (Sch in Abb. 5). Das anorganische Phosphat befindet sich jetzt im Teil CDEF (Abb. 5) und kann für die nachfolgende chemische Bestimmung oder weitere Identifizierung reserviert werden.

Das Lösungsmittel II (30 T n-Butanol + 25 T n-Propanol + 5 T Äthanol + 30 T Ammoniak (25%) + 10 T Aqua dest.) wird am Papierteil ABCD bei 25°C

zunächst für 24 Stunden mit einem Zusatz von 8-Oxychinolin und nach völliger Trocknung nochmal 12 Stunden bei Zimmertemperatur, diesmal aber "absteigend" und ohne Oxychinolin angewendet.

Nach Angaben von GERLACH, WEBER und DÖRING wird 8-Oxychinolin (15 mg / 100 ml Lösungsmittel) dem Lösungsmittel II zugefügt, um eine verbesserte Trennung zu erreichen. Seine Wirkung soll auf der Bindung von Erdalkali - und Schwermetallionen - die sich trotz Auswaschung noch im Papier befinden - zu alkohollöslichen Komplexsalzen beruhen. Hinter der Lösungsmittelfront laufen diese Salze als sichtbare grünlich-schwarze Banden aus dem Papier heraus, die dann mit dem sich absteigend saugenden Lösungsmittel II ohne Oxychinolinzusatz entfernt werden.

Dieser 2. Arbeitsgang dient zur Trennung von ATP, ADP und AMP. AMP wandert im 2. Lösungsmittel innerhalb von 36 Stunden etwa 8 cm von der Startlinie weg, etwas langsamer bewegt sich ADP, noch langsamer ATP. Die zweidimensionale Methode nach FLECKENSTEIN hat den Vorteil, daß sich die organischen Phosphorverbindungen in einem Abschnitt des Papiers lokalisieren lassen, der während der Anwendung des 1. Lösungsmittels noch nicht mit P-haltigen Verbindungen in Berührung gekommen ist.

b) Nachweis der einzelnen Phosphorverbindungen

Molybdatreaktion:

Zur Sichtbarmachung des Phosphors werden die getrockneten Chromatogramme, nach dem Verfahren von HANES und ISHERWOOD mit Molybdatreagenz (25 ml Ammoniummolybdatlösung 4 %ig + 5 ml n-HCl, Aqua bidest. ad 100,0 ml) besprayt und in feuchtem Zustand in einem Wärmeofen 7 Minuten lang einer Temperatur von 85°C zur Spaltung der Ester ausgesetzt.

Orthophosphate bilden nach dem Besprayen mit dem Reagenz sofort Ammoniumphosphormolybdat, das als gelber Fleck auf dem Papier sichtbar wird. Die leicht hydrolysierbaren Substanzen ATP und ADP spalten während

der Erhitzung in 7 Minuten so viel Orthophosphate ab, daß die Papierareale, in denen sie enthalten sind, auch als gelbgefärbte Stellen imponieren.

Die P-haltigen Bezirke des Chromatogramms erscheinen als tiefblaue Flecke, sobald man sie mit UV-Licht bestrahlt (etwa 10 Minuten) oder wenn man sie nach kurzer Behandlung mit Wasserdampf in eine H_2S -Atmosphäre bringt. Bei längerem Warten können allerdings die blauen Flecke, besonders bei feuchter Luft, abblassen oder durch Bläuung des ganzen Papiers undeutlich werden. Deshalb wurden sofort bei Sichtbarwerden der phosphorhaltigen Areale nach der Bestrahlung Photokopien angefertigt.

Resistenztest:

Eine weitere Differenzierung der phosphorhaltigen Flecke gelingt durch den Resistenztest mit Ammoniakdampf (FLECKENSTEIN, GERLACH und JANKE). Er beruht darauf, daß nur der hydrolytisch abgespaltene Phosphor eine durch Ammoniak nicht beeinflussbare Blaufärbung verursachen kann. Es gibt daher der anorganische Phosphor und der durch Erhitzung aus ATP und ADP abgespaltene labile Adenosinphosphor eine gegen Ammoniak resistente Blaufärbung, dagegen werden blaue Flecke, die auf der Anwesenheit schwer spaltbarer Phosphorsäureester beruhen, wie Adenylsäure, Glukose-6-phosphat, in wenigen Sekunden wieder ausgelöscht, wenn man sie über eine geöffnete Ammoniakflasche hält.

Photoprintverfahren:

Eine Möglichkeit zur Sichtbarmachung der UV-absorbierenden phosphorhaltigen Bezirke der Chromatogramme gestattet auch das Photoprintverfahren nach MARKHAM und SMITH. Auf einer Unterlage werden Photopapier (Agfa-Copex Papier) und darauf das Chromatogramm befestigt. Aus einer Quecksilberdampfampe wird monochromatisches Licht von der Wellenlänge 260 m μ herausgefiltert und zwar durch Vorschalten eines Nickelsulfat-Kobaltsulfat- und eines Chlorgasfilters. Das Photopapier wird dadurch belichtet und dann

entwickelt. Alle Stoffe mit charakteristischer Absorption bei 260 m μ hinterlassen helle (unbelichtete) Stellen, während das übrige Papier nach dem Entwickeln schwarz erscheint. Das Chromatogramm selbst bleibt unverändert und kann weiter zur Identifizierung verwendet werden.

c) Versuche und Ergebnisse nach Anwendung der Lösungsmittel

Abbildung 7 zeigt zunächst den auf die Startlinie aufgetragenen (2) Liquor (0,08 ml), daneben als Testsubstanzen (1) ATP (0,007 ml einer 1 %igen Lösung) und (3) Na₂HPO₄ (0,003 ml einer 1 %igen Lösung) nach Molybdatreaktion (Spray, Erhitzung, UV-Bestrahlung) ohne Wanderung. Bereits diese geringen Mengen ergeben eine kräftige Blaufärbung.

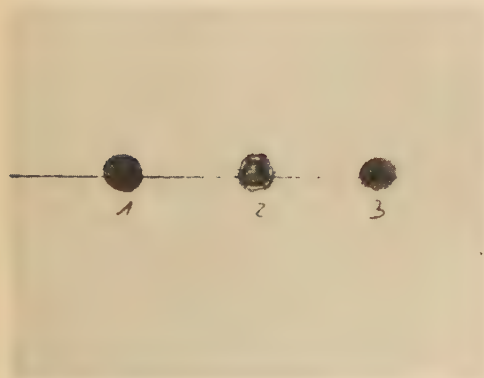


Abb. 7: Kräftige Molybdatreaktion des Liquors (2) und der beiden Testsubstanzen ATP (1) und Na₂HPO₄ (3) am Startpunkt ohne Wanderung.

Entwickelt man die Chromatogramme nach Anwendung des 1. Lösungsmittels (Abb. 8), dann ergibt sich eine starke Molybdatreaktion im anorganischen Bereich des Liquors (2) in Höhe des ebenfalls gewanderten anorganischen Testphosphors (3), während ATP (1) am Startpunkt liegen geblieben ist und nur eine ganz geringe Menge Phosphor im anorganischen Bereich erkennen läßt.

Abb. 8: Chromatogramm von:

- 1: ATP
- 2: Liquor
- 3: Na_2HPO_4

Molybdatreaktion nach Anwendung des 1. Lösungsmittels. ATP ist vorwiegend am Startpunkt liegengeblieben und zeigt nur einen geringen P-haltigen Fleck im anorg. Bereich. Na_2HPO_4 ist vollständig in den anorg. Teil abgewandert. Der anorg. Liquor-Phosphor hat sich in Höhe der anorg. Testsubstanz lokalisiert.

Abbildung 9 a und b zeigt den Resistenztest, angewandt auf diesen anorganischen Chromatogrammteil. In Abb. 9a sind die Flecke umrandet, die nach Besprayen bereits eine Gelbfärbung erkennen ließen (Orthophosphate). Nach Erhitzen und H_2S -Einwirkung (Abb. 9b) erscheinen als starke blaue Farbreaktionen: die am Startpunkt liegengebliebene ATP (1 der Abb. 9b) und ihr geringer anorganischer Anteil (a), sowie die anorganische Fraktion des Liquors (2 der Abb. 9b) und das in gleiche Höhe abgewanderte Na_2HPO_4 (3 der Abb. 9b) als anorganische Testsubstanz. Durch Ammoniak erfolgt hier keine Auslöschung sondern eher eine Verstärkung der Blaufärbung.

Trägt man nun eine etwas größere Liquormenge auf und läßt im 1. Trennungsgang das 1. Lösungsmittel längere Zeit, etwa 8-10 Stunden einwirken, dann spaltet sich der Liquor besser in seine einzelnen P-haltigen Fraktionen auf. Es ergibt sich das in Abb. 10 und 11 Dargestellte. Dem anorganischen Phosphor im Liquor (durch die Resistenz gegen Ammoniakdampf zu identifizieren!) wandert eine Fraktion nach, die sich nach der Molybdatbesprayung nicht oder nur schwach gelb anfärbt, aber eine starke Absorption im UV-Licht zeigt - nachweisbar mit dem Photoprintverfahren, dargestellt in Abb. 11 - und eine weitere, die nach Entwicklung auch eine Blaufärbung gibt. Es dürfte sich dabei wahrscheinlich um Monophosphate handeln.

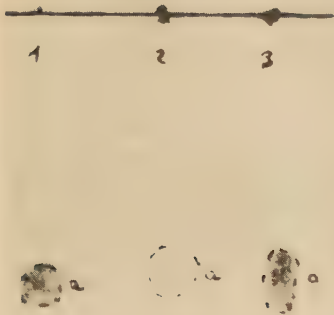


Abb. 9a:

Chromatogramm nach dem 1. Trennungsgang:

1 : ATP

2 : Liquor (Ext. b. 265 m μ : 0,842)

3 : Na₂HPO₄

Die umrandeten Flecke ließen nach der Molybdatreaktion bereits eine Gelbfärbung erkennen (Orthophosphate).



Abb. 9b:

zeigt das gleiche Chromatogramm wie Abb. 9a nach Anwendung des Resistenztestes.

1 : ATP

2 : Liquor

3 : Na₂HPO₄

Als blaue Farbreaktionen erscheinen die am Startpunkt lieengebliebene ATP (1) und ihr geringer anorganischer Anteil, sowie die anorgan. Fraktion des Liquors (2) und Na₂HPO₄ (3). Durch Ammoniakeinwirkung wird die Blaufärbung verstärkt.



Abb. 10:

Chromatogramm (anorg. Teil)

1 : Liquor (Ext. bei 265 m μ : 0,91)

2 : Fructose-1,6-diphosphorsäure

3 : Na₂HPO₄

Molybdatreaktion nach dem 1. Trennungsgang.

Nach verlängerter Laufzeit im 1. Lösungsmittel Aufspaltung des anorganischen Liquorphosphors in seine 3 Fraktionen.

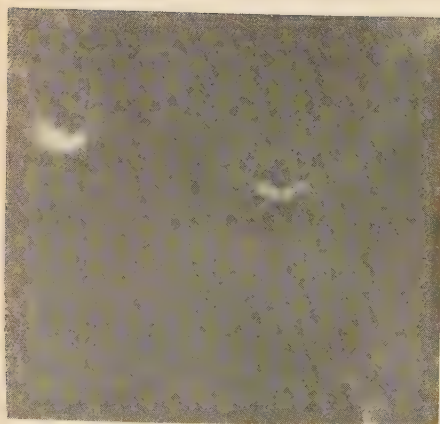


Abb. 11:

UV - absorbierender Teil des anorganischen Phosphors im Liquor.
(Photoprintverfahren)

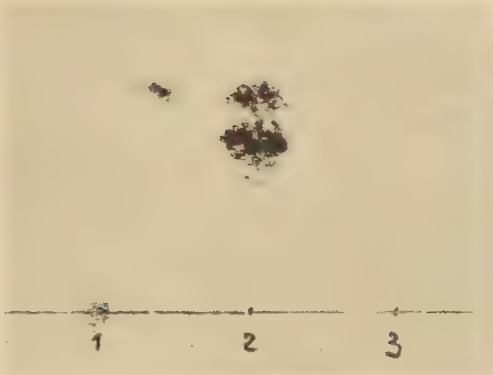


Abb. 12: Molybdatreaktion nach dem 2. Trennungsgang. (organ. Teil)
Chromatogramm von: 1: Liquor (Ext bei 265 m μ : 1.89)
2: ATP
3: Na₂HPO₄

Im Liquorbereich ADP deutlich ausgeprägt. Hinter ADP wandert ATP (2). Im Bereich des anorganischen Phosphors keine P-haltigen Stellen, da das Na₂HPO₄ bereits im 1. Trennungsgang vollständig in den anorganischen Chromatogrammteil abgewandert ist.



Abb. 13:
Chromatogramm (organ. Teil) von:
1: Liquor (Ext. bei 265 m μ : 1,91)
2: Inosintriphosphorsäure
3: ATP

Übereinstimmen der Position des P-Areals von Liquor mit der ATP-(ADP) Testsubstanz.
Inosintriphosphorsäure (2) hat einen anderen R_F - Wert.

Nach dem 2. Trennungsgang ließ sich bei vorsichtigem Auftragen größerer Liquormengen (0,7 - 1,0 ml) ein den organischen Phosphor enthaltendes Areal nachweisen, das genau mit der Position einer Fraktion der aufgetropften ATP-Testsubstanz übereinstimmt (Abb. 12).

Es dürfte sich dabei um die aus der ATP abgespaltene ADP handeln. Im Bereich des sekundären Natriumphosphats findet sich kein Anhalt für Phosphor, da diese anorganische Testsubstanz bereits im 1. Trennungsgang in den anorganischen Teil des Chromatogramms abgewandert ist. Auch hier wurde der Befund durch den Resistenztest nachgeprüft, da der aus ATP und ADP durch 7 Minuten Erhitzung auf 85°C abgespaltene labile Adenosinphosphor eine durch Ammoniak nicht beeinflussbare Blaufärbung zeigt.

Bei Verwendung anderer P-haltiger Testsubstanzen wie Inosintriphosphorsäure (Abb. 13), Glukose-6-phosphorsäure (Abb. 14) und Fruktose-1,6-diphosphorsäure ergab sich, daß diese in verschiedene Positionen abwandern, die mit dem P-haltigen Areal im organischen Liquorbereich nicht übereinstimmen, was auch durch die R_f -Werte bestätigt wird.

Abb. 14: Molybdatreaktion
nach dem 2. Trennungsgang.

Chromatogramm von:

- 1: ATP
- 2: Liquor, 1,0 ml, Ext. bei 265 m μ 1,02
- 3: Glukose-6-phosphorsäure

Kein Anhalt für organischen Phosphor im Liquor-Bereich. Die Glukose-6-phosphorsäure-Position stimmt auch nicht mit der der ATP überein.



d) Sicherung der Ergebnisse mittels des R_f -Wertes

Die Übereinstimmung der organischen P-haltigen Flecke im Liquor-chromatogramm mit den P-haltigen Arealen der jeweiligen Testsubstanzen kann noch durch die Errechnung des R_f -Wertes gesichert werden.

Das Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit einer Verbindung ist der sog. R_f -Wert, der definiert wird als der Quotient aus Entfernung der Substanz vom Ausgangspunkt und der Entfernung der Lösungsmittelfront von der Startlinie.

$$R_f = \frac{\text{Strecke: Startpunkt bis Substanzfleckmittelpunkt}}{\text{Strecke: Startpunkt bis Lösungsmittelfront}}$$

Jede papierchromatographisch analysierbare Substanz hat bei der Verwendung eines ganz bestimmten Lösungsmittels eine bestimmte Wanderungsweite im Vergleich zum Wanderungsweg des Lösungsmittels. Die R_f -Werte sind immer kleiner als 1 und lassen sich nur reproduzieren, wenn Temperaturänderung, Verunreinigung des Lösungsmittels und Konzentrationsänderung vermieden werden. Auch können nach GRUNZE und THILO geringe Schwankungen vorkommen, da bei Gemischen manchmal kleine Verdrängungseffekte auftreten, die aber nur in seltenen Fällen die Identifizierungsmöglichkeit durch die mitgelaufenen Testsubstanzen beeinträchtigen.

e) Bemühungen um ein Konzentrierungsverfahren zur Anreicherung der organischen P-Bestandteile im Liquor

Um den anorganischen Phosphor des Liquors chromatographisch nachzuweisen, bedarf es des Aufbringens von nur sehr wenig Liquor (0,06 ml), da auch die chemischen Bestimmungen schon den relativ großen Anteil an anorganischem Phosphor gezeigt haben. Jedoch ist es erst nach sehr vielen Vorversuchen gelungen, ein P-haltiges Areal auch im organischen Bereich zu erhalten und zu identifizieren. Auffallenderweise war dies bisher

aber nur bei Liquores mit sehr hoher Extinktion (über 1,3) bei 265 m μ und einer Auftragsmenge von 0,5 - 1,0 ml möglich. Bei Liquores mit niedrigen Extinktionen scheinen die organischen Phosphorverbindungen in so geringem Maße vorzuliegen, daß wohl relativ große Liquormengen nötig sind, um eine Molybdatreaktion zu erhalten (Abb. 14 und 16). Eine entsprechende Vergrößerung der Auftragsmenge bringt aber eine bedeutende Verlängerung der Auftragszeit mit sich. Das Auftropfen von 0,75 ml Liquor nahm schon etwa 4-5 Stunden in Anspruch. Da nach FLECKENSTEIN bereits nach kurzer Zeit - sogar bei Temperaturen von -18°C - die ATP zerfällt, war hier auch der große Zeitverbrauch störend.

Konzentrierungsversuche in Form von abgewandelter Säulenchromatographie mit liquorgetränktem Zellulosepulver, wodurch man verhältnismäßig große Mengen in kurzer Zeit der chromatographischen Wanderung zuleiten konnte, führten nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

Um aber trotzdem in relativ kurzer Zeit eine größere Menge auf das Filterpapier tropfen zu können, wurde nach Anregung von STEGER der Liquor zur Hälfte direkt auf das Chromatogramm-Papier aufgetragen, der übrige Teil auf ein rundes Filterpapierplättchen, im Durchmesser 0,8 cm groß, das seitlich 2 Ansatzteile hatte  und ebenso wie die großen Papiere mit Titriplex vorbehandelt worden war. Die beiden Ansatzteile wurden durch 2 Schlitze in das Chromatogramm gesteckt, genau über dem Startpunkt festgezogen und dann der Einwirkung der Lösungsmittel überlassen. Der Vorteil dieser Methode ist der Zeitgewinn, da die Auftragsfläche jetzt doppelt so groß geworden ist.

Abbildung 15 zeigt den auf diese Art erhaltenen ADP-Fleck im Liquorbereich (2), der allerdings jetzt in zwei, auf gleicher Höhe liegende Areale aufgespalten ist, was sich vielleicht durch den engeren Kontakt der beiden Papiere an der Durchzugstelle und die Abwanderung des Liquors vorwiegend von dieser Fläche aus erklären ließe.



Abb. 15: Molybdatreaktion nach dem 2. Trennungsgang

Chromatogramm von:

- 1: ATP
- 2: Liquor (Ext. bei 265 m μ : 1,52)
- 3: Ribonukleinsäure

Aufspaltung des P-haltigen Areals im organischen Liquorbereich in 2 Teile und Übereinstimmen mit der ADP-Position

Jedenfalls gelingt es auf diese Weise in der Hälfte der Zeit den Liquor aufzutragen, dadurch den trotz Eiskühlung anhaltenden ATP-Zerfall zu vermindern und die positiven Ergebnisse zu vermehren.

f) Einige besondere Beobachtungen

Bei einigen chromatographischen Versuchen war zu beobachten, daß die ATP-Testsubstanz nach dem 2. Trennungsgang sich in 3 Fraktionen aufgeteilt hatte. Da die ATP unter stufenweiser Abspaltung von 2 Phosphorsäuremolekülen über ADP in AMP übergeht, könnte die am weitesten vom Startpunkt wegwandernde Fraktion der Adenylsäure (AMP) entsprechen. Diese Position stimmt auch mit der reinen Testsubstanz überein (Abb. 16). In mehreren Fällen war dann das organischen Phosphor enthaltende Areal des Liquors in Höhe der am weitesten gewanderten P-haltigen Fraktion der ATP-Testsubstanz anzutreffen (Abb. 17).

Im Resistenztest konnte der oberste Teil der ATP durch Ammoniak ausgelöscht werden. Dies würde neben der Positionsgleichheit mit AMP für Adenylsäure sprechen.

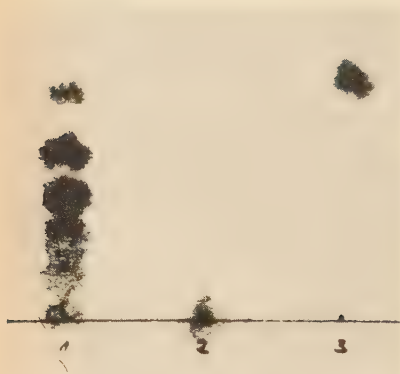


Abb. 16:

Molybdatreaktion nach dem 2. Trennungsgang.

Chromatogramm von:

1 : ATP

2 : Liquor (Ext. bei 265 m μ : 1,07)

3 : Adenylsäure (= AMP)

Die 3. ATP Fraktion und die Adenylsäure haben die gleiche Position.

Im Liquorbereich (2) kein organischer Phosphor nachweisbar.



Abb. 17:

Molybdatreaktion nach dem 2. Trennungsgang.

Chromatogramm:

1 : Liquor, (Extinktion bei 265 m μ : 1,87)

2 : ATP

3 : Na₂HPO₄

Der Liquor zeigt eine P - Reaktion in Höhe der 3., (hier nur angedeuteten) ATP Fraktion. (Adenylsäure)

Der anorganische Phosphor (3) ist bereits in den anorg. Chromatogrammtail abgewandert.

Es konnte also bei diesen chromatographischen Untersuchungen neben ADP auch Adenylsäure nachgewiesen werden. Es fand sich auch hier eine Parallelität zwischen Höhe der Extinktion des Liquors bei 265 μ und dem Gehalt an organischen Phosphor-Verbindungen.

g) Liquor-Phosphoruntersuchungen verschiedener Autoren

Der Nachweis des anorganischen Phosphors und der organischen Phosphorverbindungen im Liquor hat einen eindeutigen Zusammenhang mit dem Absorptionsmaximum bei 265 μ erbracht. Eine Steigerung dieser Stoffe im Liquor geht mit einer Erhöhung der Extinktion bei 265 μ einher. HOFFMANN sah, wie bereits erwähnt, bei entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems - die nach STEGER ein hohes Absorptionsmaximum bei 265 μ haben - ein Ansteigen der Phosphorwerte des Liquors. Die normale Blut-Liquorschranke soll aber nach STARY, KRÁL und WINTERNITZ für Phosphate nicht durchgängig sein. Eine erhöhte Durchlässigkeit der Liquorschranke für Phosphate haben QUADBECK und HELMCHEN nach schweren Gehirnerschütterungen gesehen. Nach LANG bildet sich zwischen dem Phosphat im Liquor und demjenigen in den Gehirnzellen innerhalb kurzer Zeit ein Gleichgewicht aus. Ob dabei die Aufnahme von Phosphat in den Zellen ein reiner Diffusionsprozeß ist oder ob sich bei dem Durchtritt durch die Zellwände chemische Reaktionen (etwa Bildung von Zucker-Phosphorsäure-Estern) abspielen, vielleicht auch das System Adenosin-triphosphorsäure beteiligt ist, ließ sich noch nicht entscheiden. ODESKY macht für den erhöhten Liquorphosphorgehalt eine Zerstörung phosphorhaltigen Nervengewebes und bei viralen Infektionen eine Direktwirkung der Viren auf phosphorhaltige Hirngewebskomponenten verantwortlich. Außerdem sollen nach NEUBERG und MANDL die ATP und andere Phosphorsäureverbindungen für den Transport von Substanzen, die sonst im Gewebe unlöslich sind, Bedeutung haben. SPIEGEL-ADOLF erwähnt eine gesteigerte Menge von Nukleinsäure und verwandten Substanzen bei Anwesenheit von Tumorgewebe mit seinem erhöhten Stoffwechsel. Die hohe Extinktion im Bereich von 265 μ und der erhöhte Phosphorgehalt im Liquor bei Tumoren und entzünd-

lichen Prozessen würde dafür sprechen. Das fehlende oder niedrige Absorptionsmaximum bei cerebralen Gefäßprozessen und Encephalomalacien könnte nach STEGER durch Fermente und Inaktivatoren erklärt werden, die aus dem Gehirn oder aus dem Serum in den Liquorraum gelangen, unter bestimmten Bedingungen wirksam werden und die selektive Absorption der an der Höhe des Maximums 265 $m\mu$ beteiligten Substanzen einschränken oder verhindern, oder auch den Abbau in solche Stoffe fördern, die für diesen Wellenbereich optisch inaktiv sind. Ebenso läßt die Tendenz, das Maximum des Liquors bei 265 $m\mu$ abzubauen - nach STEGER - an das Einwirken entsprechender Fermentsysteme denken.

Die Vermutung über die Beteiligung organischer Verbindungen am Aufbau des Absorptionsmaximums bei 265 $m\mu$ wird gestützt durch Versuche mit radioaktiven Stoffen, die STEGER bereits 1953 vorgenommen hat. Da nach SCHILD und MAURER der Einbau von radioaktivem Phosphor nicht an die Struktur der Erythrocyten gebunden ist, sondern auch in Haemolysaten vor sich geht, hat STEGER analoge Einbauversuche am frischen, nicht zellhaltigen Liquor vorgenommen. Er fand, daß bei manchen Liquores der Einbau von markiertem Phosphor in die ATP und in die Kreatininphosphorsäure erfolgt. Aus diesem Einbau lassen sich ebenfalls Schlüsse auf das Weitergehen des Phosphatumsatzes nach der Liquorentnahme ziehen.

III.

ZUSAMMENFASSUNG

Der frische Liquor cerebrospinalis weist im UV-Licht eine charakteristische Absorptionskurve mit dem Gipfel bei 265 m μ auf. Das UV-Spektrum des Liquors im Bereich zwischen 220 - 320 m μ verändert sich bei Alterung und Temperatureinflüssen, sowie unter Bebrütungsbedingungen.

In vorliegenden Untersuchungen war die Frage nach den Substanzen gestellt, die das Maximum bei 265 m μ im Liquor aufbauen. Wir beschränkten uns auf die Ascorbinsäure und den Phosphorgehalt.

I. Ascorbinsäuregehalt

1. Durchgeführte titrimetrische Bestimmungen im Liquor mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol lassen eine Parallelität zur Extinktionshöhe bei 265 m μ erkennen. Von 56 Liquores wurde einmal der Ascorbinsäure-Gehalt bestimmt, zum anderen deren jeweilige Extinktion bei 265 m μ . Es wurden 3 Gruppen von Extinktionshöhen gebildet, nämlich die Gruppe mit niedriger Extinktion (unter 0,7), die mittelhohe Gruppe (Extinktion zwischen 0,7 - 1,2) und die Gruppe mit hoher Extinktion (über 1,2), sowie für jede Gruppe der Durchschnittswert des Ascorbinsäuregehaltes errechnet. Liquores mit niedriger Extinktion ergaben auch geringe Werte bei der Ascorbinsäurebestimmung. Dagegen zeigten Liquores mit hoher Extinktion auch einen hohen Ascorbinsäuregehalt.

2. Bei Versuchen mit frisch bereiteter reiner Ascorbinsäurelösung fanden wir einen Absorptionsgipfel bei 255 m μ , der aber nach Zeiteinwirkung, Einleiten von Sauerstoff und Lichtzutritt deutlich an Höhe abgebaut wird und nach den Wellenlängen 260/265 m μ verschoben erscheint.

3. Versuche mit reiner Ascorbinsäure und Liquor-Ascorbinsäuremischungen zeigten, daß die Höhe des Absorptionsmaximums bei 265 $m\mu$ unter Bebrütungsbedingungen bei der Liquor-Ascorbinsäuremischung und bei reiner Ascorbinsäure schneller absinkt als bei nativem Liquor.

Da die Ascorbinsäure allein für das Zustandekommen des 265 $m\mu$ -Maximums nicht voll verantwortlich sein kann, wurde versucht, die Beziehung zwischen dem Maximum bei 265 $m\mu$ und dem Phosphorgehalt des Liquors aufzudecken.

II. Phosphorverbindungen

1. Der Gehalt an anorganischem und Gesamtphosphor von 47 Liquores wurde nach der Methode von BERENBLUM und CHAIN bestimmt und die Durchschnittswerte für die Extinktionsgruppen (niedrige, mittelhohe und hohe) berechnet. Die Korrelation zwischen Extinktionshöhe bei 265 $m\mu$ und dem Phosphorgehalt des Liquors ergibt sich auch hier. Liquores mit niedriger Extinktion haben einen niedrigen Phosphorgehalt, Liquores mit hoher Extinktion weisen auch höhere Durchschnittswerte für anorganischen und Gesamtphosphor auf.

2. Da der anorganische Phosphor nur eine unwesentliche Absorption im Wellenbereich von 220 - 320 $m\mu$ hat, gingen wir der Frage nach, ob das Maximum 265 $m\mu$ nicht auch durch organische Phosphorverbindungen bedingt sein könnte. Es wurden Lösungen der organischen Phosphorsubstanzen ATP, AMP und Ribonukleinsäure der UV-Messung im Wellenbereich 220 - 320 $m\mu$ unterzogen. Der Verlauf der Absorptionskurven dieser Substanzen zeigte eine überzeugende Ähnlichkeit mit der Absorptionskurve des Liquors.

3. Nach einigen allgemeinen Hinweisen auf die Papierchromatographie wird das zweidimensionale papierchromatographische Verfahren nach FLECKENSTEIN und die Auswertung der Chromatogramme durch die Molybdatreaktion,

den Resistenztest und das Photoprintverfahren beschrieben.

Der Nachweis der organischen Phosphorverbindungen ATP und Adenylsäure erfolgte mit Hilfe der FLECKENSTEINSchen Methode. Der Liquor konnte dadurch in seine organischen und anorganischen Phosphorkomponenten getrennt werden und das Vorhandensein dieser Phosphorverbindungen papierchromatographisch belegt werden.

4. Die Ergebnisse wurden durch den Resistenztest und die Errechnung des R_f -Wertes gesichert.

5. Durch Konzentrierungsversuche des Liquors wurde der trotz Eiskühlung des Liquors schnelle Zerfall der ATP aufgehalten; dadurch konnten die positiven Ergebnisse vermehrt werden.

6. An Hand von Liquor-Phosphoruntersuchungen verschiedener Autoren wird die Vermutung bestätigt, daß anorganische und organische Phosphorverbindungen am Aufbau des UV-Maximums des Liquors bei 265 $m\mu$ beteiligt sein müssen.

An dieser Stelle sei in aufrichtiger Dankbarkeit des verstorbenen Privatdozenten Dr. Dr. Steger, Oberarzt an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg, gedacht. Er überließ mir das Thema und gab mir wertvolle Hinweise und Anregungen während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Schaltenbrand darf ich für die Übernahme des Referates vielmals danken.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Dr. Steger für ihre Ratschläge meinen Dank aussprechen.

L I T E R A T U R

- BERENBLUM, J. and
E. CHAIN: An improved Method for the Colorimetric
Determination of Phosphate.
The biochem. Journ. 32, 295 (1938)
- CONDEN, R.: Nature (London) 162, 359 (1948)
- CONDEN, R., A.H. GORDON
u. A.J.P. MARTIN: Biochem. Journ. 41, 590 (1947)
- CRAMER, F.: Papierchromatographie
Verlag Chemie 1953
- FLECKENSTEIN, A.: Der Kalium- Natrium- Austausch als Energie-
prinzip in Muskel und Nerv.
Springer Verlag 1955
- FLECKENSTEIN, A., E. GERLACH
und J. JANKE: Ein neuer Schnelltest zur Identifizierung
leicht und schwer hydrolysierbarer Phos-
phorsäure-Ester im Papierchromatogramm.
Naturw. 40, 462 (1953)
- FLECKENSTEIN, A. und
J. JANKE: Papierchromatographische Trennung von ATP
und ADP und anderen Phosphorverbindungen
im kontrahierten und erschlaferten Frosch-
muskel.
Pflügers Archiv 258, 177 (1955)
- FRIEDMAN, A. and
A. LEVINSON: Cerebrospinal fluid inorganic phosphorus
in normal and pathologic conditions.
Arch. of Neur. 74, 424 (1955)
- GERLACH, E. und E. WEBER: Papierchromatographische Trennungsmethode
für die säurelöslichen Phosphorverbindungen
aus Nierengewebe.
Arch.f.exper.Path. u. Pharmakol. 224, 496
(1955)
- GERLACH, E., E. WEBER
und H. DÖRING: Einige neue Lösungsmittel für die Papier-
chromatographie von Phosphorsäureestern.
Arch.f.exper. Path. u. Pharmakol. 226, 496
(1955)
- GRUNZE, H. und E. THILO: Die Papierchromatographie der kondensier-
ten Phosphate.
Akademie Verlag 1955
- HALLMANN, L.: Klinische Chemie und Mikroskopie.
Thieme Verlag 1950
- HANES, C.S. and F.A. ISHERWOOD: Separation of the phosphoric esters on the
filterpaper chromatogram.
Nature (London) 164, 1107 (1949)
- HOFFMANN, K.: Der anorganische Phosphor im Liquor.
Dtsch.Zschr.f.Nervenheilk. 174, 482 (1956)

- HOFFMANN, K.: Der anorganische Phosphor im Liquor.
(Klinische Ergebnisse)
Dtsch.Zschr.f.Nervenheilk. 174, 489 (1956)
- KOVACS, E.: Ultraviolet light absorption in normal and
pathological cerebrospinal fluids.
Canad.J.of Biochem.a.Physiol. 32, 526 (1954)
- LANG, K.: Der intermediäre Stoffwechsel
Springer Verlag 1954
- LAVES, W.: Über die photometrische Aktivitätsprüfung
der Serumribonuklease.
Münch.Med.Wschr. 1953 S.74
- LEHNARTZ E.: Einführung in die chemische Physiologie.
Springer Verlag 1952
- MARKHAM, R. and I.D. SMITH: Chromatographic studies of nucleic acids.
Biochem.J. 45, 294 (1949)
- MARTIN, A.J.P. and R.L.M.SYNGE: Biochem.J. 35, 1358 (1941)
- MERCK, E.: Medizinisch - chemische Untersuchungsmethoden.
Verlag Chemie 1956
- MERCK, E.: Säulenchromatographie, Papierchromatographie.
E.Merck, Darmstadt
- NEUBERG, C. and J. MANDEL: Arch.Biochem. 23, 499 (1949)
- ODESSKY, L., L.P. ROSENBLATT,
A.V.BEDO and L.LANDAU: Cerebrospinal fluid inorganic phosphorus
in normal individuals and in those with
viral involvement of the central nervous
system.
J.Labor.a.Clin.Med. 41, 745 (1953)
- ODESSKY, L., L.P. ROSENBLATT,
SANDS, SCHIFF: Cerebrospinal fluid inorganic phosphorus
in acute poliomyelitis.
Arch.of Neur. 73, 255 (1955)
- PRATUSEVIČ, R.M.: Über Veränderungen des Ascorbinsäuregehalts
im Liquor cerebrospinalis und im Blut bei
einigen Neuroinfekten bei Kindern.
Ref. im Zentralblatt 121, 168 (1953)
- QUADBECK, G. und A.HELMCHEN: Steigerung des Phosphatübertritts vom Blut
in das ZNS nach schweren Gehirnerschütterungen bei der Katze.
Z.Naturforsch. 103, 328 (1955)
- SCHILD, K.T. und W. MAURER: Papierelektrophorese radioaktiv markierter
Hämolyse menschlicher Erythrozyten.
Naturwissenschaften 38, 303 (1951)
- SEUBERLING, O.: Bestimmung der Phosphatasewirkung im Liquor
cerebrospinalis.
Dtsch. Zschr.f.Nervenheilk. 151, 220 (1940)

- SOPHIAN, L.H. and
O' CONOLLY: UV-Absorption Spektra of normal cerebro-
spinal fluid.
J.Physc.Chem. 55, 712 (1951)
- SPIEGEL - ADOLF M. and
H.T.WYCIS: Ultraspectrographic studies on cerebrospi-
nal fluids.
J.Physiol.Chem. 50, 447 (1946)
- SPIEGEL - ADOLF M. and
H.T.WYCIS: Ultraspectrophotometry of cerebrospinal
fluids in tumors of the cerebral nervous
system.
Confinia neurologica (Basel) 11, 87 (1951)
- SPIEGEL - ADOLF M.,
H.T.WYCIS and
E.A.SPIEGEL: Chemical analysis of spectrophotometric
findings in the cerebrospinal fluid.
Science 109, 335 (1949)
- STARY, Z., A. KRAL und
R. WINTERNITZ: Über die Verteilung der Elektrolyten auf
Blut und Liquor cerebrospinalis.
III. Chlor-Phosphor Z.exper.Med. 68, 441
(1929)
- STEGER, J.: Beitrag zur Liquordiagnostik.
Habilitationsschrift Würzburg 1955
- STEGER, J.: Erfahrungen über neue Eiweißbestimmungen
für den Liquor.
Ber.d.Physik. Med. Gesellschaft zu Würzburg.
Neue Folge BD 67 (1955)
- SUBBAROW, Y. and
C.H.FISKE: The colorimetric determination of phos-
phorus.
J.of Biol. Chem. 66, 375 (1925)
- TSWETT, M.S.: Ber.dtsch.bot.Ges. 24, 234, 361, 384 (1906)

LEBENS LAUF

Am 13. September 1926 wurde ich als Tochter des Staatsbeamten Ernst Imhoff und seiner Ehefrau Edith in Gleiwitz/Oberschlesien geboren. Von 1932 bis 1936 besuchte ich dort die Volksschule, anschließend die Oberschulen in Oppeln und Wien. In Jena wurde ich von 1946 bis 1948 als med. techn. Assistentin ausgebildet. Nach einigen Jahren der Berufstätigkeit begann ich im November 1952 an der Julius - Maximilians - Universität in Würzburg mit dem Medizin - Studium. Hier legte ich das Physikum und im Winter 1958 auch das Staatsexamen ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Marianne Imhoff.

